

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

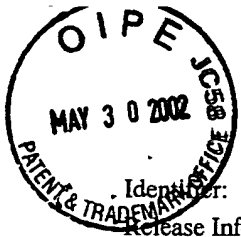
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



RECEIVED
JUL 22 2002
TECH CENTER 1600/2900

Identifier: AAI97024 cDNA Sequence 748 BP
Release Info: Derwent Geneseq Database Release No. 200210; Date released 05-MAY-02
Database XReference: WPI; 2001-565584/63.
Accession Number: AAI97024
Patent Title: Nucleic acids originating in gene expressed in human neuroblastoma, useful as probe or primer in diagnosing prognosis of human neuroblastoma, malignancy and susceptibility indicator or tumour marker for anti-cancer agents -

Patented by: (CHIB-) CHIBA PREFECTURE.;(HISM) HISAMITSU PHARM CO LTD.

Inventor: Nakagawara A

Description: Human neuroblastoma expressed polynucleotide SEQ ID NO 3099.

Patent Number: WO200166719-A1

Patent Publication Date: 13-SEP-2001

Modification Date: 13-NOV-2001 (first entry)

Local Filing: 02-MAR-2001; 2001WO-JP01629

Priority: 07-MAR-2000

Abstract: The invention relates to novel genes (AAI93926-AAI97963) expressed in human neuroblastoma. The nucleic acids are applicable as a probe or primer in diagnosing the prognosis of human neuroblastoma, malignancy and susceptibility indicators or tumour markers for anti-cancer agents. The gene information for diagnosing prognosis is related to factors similar to that for N-myc and TrkA genes.

KeyWords: Human;neuroblastoma;malignancy;cancer;tumour marker;N-myc;TrkA;ss.

Organism: Homo sapiens.

Sequence Composition: Sequence 748 BP; 201 A; 155 C; 176 G; 196 T; 20 other;

Sequence: >AAI97024 WO200166719-A1 PA (CHIB-) CHIBA PR 07-MAR-2000 PF 02-MAR-2001
Human neuroblastoma expressed polynucleotide SEQ ID NO 3099. [Homo sapiens.]
GNNNNNNNNNTGNNTNNNNNTTTGAANCCCTTGGGCACTGCCGGCCTACTGGCTTCCGCAC
ACTGAAGAGTACGTCTTCGGGTCTACCCCTAATCACATAATGGCTGTGTTAATCAGAAG
TCTGTCTCGGACATGATTAAAGAGTTTCGAAAAAATTGGCGTGCTCTTTGTAACCTCTGAG
AGAACTACTCTATGTGGTGCAGACTCCACGCTCTTGGCATTGCAGCTTTCTATGGCAGAG
AACAACAAACAGCACAGTGGAGAATTTACAGTCTCTCTCAGTGATGTTTTATTGACATGG
AAATACTTGCTCCATGAGAAATTGAACTTACCAGTTGAAAACATGGACGTGACTGACCAT
TATGAGGACGTTAGGAAGATTTATGATGATTTCTTGAAGAACAGTAATATGTTANATCTG
ATTGATGTTTATCAAAAATGTAGGGCTTTGACTTCTAATTGTGAAAATTATAACACAGTA
TCTCCTGGGTCAACTATACAGCCACCTTCAGAAAAGAGGAAGCTTGCTGCTGTCTGTCTAG
GCCAGATCTCTTGGCTCCTGGGGAAGATCCACCAGTGTGTCAGCCTCATTGACTCTGGAGCG
GCAGAAGGGAGAGNCCTCTTAGCATGGAGCTGGTCCCTAAACTTCAGATTGCCTGGGATT
CCATCACGGTCCAGAAGAAGAGACGAGACCTGAAGAACTGGCGGCTGCATGCGGCAAGTG
AGACAATGGGGAAAGCCACCCCTTTANN

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 9 月 13 日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66719 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/53, 33/566 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原章 (NAK-AGAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒260-0801 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/01629 (74) 代理人: 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2001 年 3 月 2 日 (02.03.2001) (81) 指定国 (国内): US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-159195 2000 年 3 月 7 日 (07.03.2000) JP 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒260-8667 千葉県千葉市中央区市場町1番1号 Chiba (JP). 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町408 Saga (JP). 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENE CLONED IN HUMAN NEUROBLASTOMA AND NOVEL GENE FRAGMENTS

(54) 発明の名称: ヒト神経芽細胞腫においてクローニングされた新規遺伝子および新規遺伝子の断片

(57) Abstract: Nucleic acids originating in a novel gene expressed in human neuroblastoma which comprise one sequence selected from the group of the nucleic acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 4038 in Sequence Listing or nucleic acids complementary thereto; fragments of these nucleic acids; use thereof as a probe or a primer; and a method of diagnosing the prognosis of human neuroblastoma by using any of them.

(57) 要約:

ヒト神経芽細胞腫において発現する新規な遺伝子に由来する核酸であって、配列表の配列番号 1 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなる核酸またはそれに相補的な核酸、およびその核酸の断片、並びにそれらのプローブ或いはプライマーとしての使用、さらにそれらのいずれかをを用いるヒト神経芽細胞腫の予後の診断が開示される。

WO 01/66719 A1

明細書

ヒト神経芽細胞腫においてクローニングされた新規遺伝子および新規遺伝子の断片

技術分野

- 5 本発明は、ヒト神経芽細胞腫において発現する新規な遺伝子に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒト神経芽細胞腫において発現する新規な遺伝子に由来する核酸類およびそれらの断片に関する。

背景技術

- 10 個々の腫瘍にはそれぞれの個性があり、発癌の基本的な原理は同じであっても、その生物学的特性は必ずしも同じではない。近年、癌の分子生物学や分子遺伝学が急速に進歩し、発癌やいわゆる腫瘍細胞のバイオロジーが遺伝子レベルで説明できるようになってきた。

(神経芽細胞腫)

- 15 神経芽細胞腫は、末梢交感神経系細胞に由来する交感神経節細胞と副腎髄質細胞に発生する小児癌である。この交感神経系細胞は、発生初期の神経堤細胞が腹側へ遊走し、いわゆる交感神経節が形成される場所で分化成熟したものである。その一部の細胞は、さらに副腎部へ遊走し、先に形成されつつある副腎皮質を貫通して髄質部に達し、そこで髄質を形成する。神経堤細胞は、ほかの末梢神経細胞の起源ともなっており、後根神経節（知覚神経）、皮膚の色素細胞、甲状腺C細胞、肺細胞の一部、腸管神経節細胞などへ分化する。神経芽細胞腫は広範囲に転移し、メラノーマ、髄様癌、肺小細胞癌、Hirschsprung病などの癌が発生する。

(神経芽細胞腫の予後)

- 25 神経芽細胞腫は多彩な臨床像を示すことが特徴である（中川原：神経芽腫の発生とその分子機構 小児内科 30, 143, 1998）。例えば、1歳未満で発症する神経芽細胞腫は、非常に予後が良く、大部分が分化や細胞死を起こして

自然退縮する。現在、広く実施されている生後6か月乳児の尿のマススクリーニングで陽性となる神経芽細胞腫の多くは、この自然退縮を起こしやすいものに属する。一方、1歳以上で発症する神経芽細胞腫は、悪性度が高く、多くの場合、患児を死に至らしめる。1歳以上の悪性度の高い神経芽細胞腫では、体細胞突然変異 (Somatic mutation) が起こり、モノクローナルであるの
5 に対し、自然退縮する神経芽細胞腫では、生殖細胞突然変異 (germline mutation) のみの遺伝子変異でとどまっていると考えられている。Knudson AG等: Regression of neuroblastoma IV-S: A genetic hypothesis. N Engl J
10 Med 302, 1254 (1980) を参照。

(神経芽細胞腫の予後診断を可能にする腫瘍マーカー)

最近の分子生物学的研究の進展により、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の高親和性レセプターであるTrkAの発現が分化と細胞死の制御に深くかかわっていることが明らかとなってきた。Nakagawa A., The NGF story and neuroblastoma, Med Pediatr Oncol, 31, 113 (1998) を参照。Trkは膜貫通型レセプターでもあり、Trk-A、B、Cの3つがその主なものである。これらTrkファミリー・レセプターは、中枢神経および末梢神経系において、特異的な神経細胞の分化と生存維持に重要な役割を果たしている。中川原等: 神経芽細胞腫におけるニューロトロフィン受容体の発現と予後 小児外科 29: 425-432, 1997を参照。ところで、腫瘍細胞の生存や分化は、TrkチロシンキナーゼやRetチロシンキナーゼからのシグナルで制御されている。なかでも、TrkAレセプターの役割は最も重要で、予後良好な神経芽細胞腫ではTrkAの発現が著しく高く、これからのシグナルが
20 腫瘍細胞の生存・分化、または細胞死 (アポトーシス) を強く制御している。一方、予後不良な神経芽細胞腫では、TrkAの発現が著しく抑えられており、こ
25

れに代わって、TrkBあるいはRetからのシグナルが生存の促進という形で腫瘍の進展を助長している。

また、神経の癌遺伝子であるN-mycの増幅が神経芽細胞腫の予後に関連していることも明らかになってきた。中川原：脳・神経腫瘍の多段階発癌，Molecular Medicine, 364, 366 (1999)を参照。この
5 遺伝子は神経芽細胞腫で初めてクローニングされが、正常細胞や予後良好な神経芽細胞腫では通常1倍体当たり1つしか存在しないのに対し、予後不良の神経芽細胞腫においては数十倍に増幅されているのが見つかった。このようにN-mycの増幅は、腫瘍の進行度に深く関係している。

10 しかしながら、現在までに、神経芽細胞腫に発現される癌遺伝子は、N-myc以外知られておらず、その予後の良不良に関する遺伝子情報に関しても、N-mycについて以外は全く不明であった。

発明の開示

本発明は、かかる事情に鑑みてなされたものであり、神経芽細胞腫において発
15 現する新規な遺伝子の情報を明らかにし、さらに予後の良不良に関係する前記遺伝子の情報をも明らかにし、それらの遺伝子情報に基づいて、神経芽細胞腫の予後の良不良に関する遺伝子診断を可能とすることを目的とする。

本発明者は上記目的に従い、鋭意研究を重ねた結果、ヒト神経芽細胞腫の予後
20 を検定し、予後良好および予後不良の臨床組織の各々からcDNAライブラリーを作製することに成功した。さらに、これらの2種類のcDNAライブラリーから各々約2400クローンをクローニングし、神経芽細胞腫の予後の良悪によって分類した。

また、本発明者は、前記クローニングされた遺伝子の両末端シーケンスを決定し、ホモロジー検索を行って新規な遺伝子のみを選出した。その結果、前記ヒ
25 ト神経芽細胞腫由来のcDNAライブラリーは、他の細胞由来のものに比べ、新規な遺伝子の割合が非常に高頻度であることを確認した。

さらに、本発明者は、上記のように分類した新規な遺伝子群を比較すると、いくつかの遺伝子で神経芽細胞腫の予後良好な臨床組織でのみ発現が増強していることを見いだした。

かかる知見に基づき、本発明者は、ヒト神経芽細胞腫において発現する新規な
5 遺伝子を検出およびクローニングするための遺伝子情報（核酸配列）を提供する、
ことを可能にした。さらに、前記核酸配列情報に基づき、神経芽細胞腫の予後の
遺伝子診断、およびそのために使用可能な腫瘍マーカーを選出することを可能と
し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、下記 1～15 に記載の核酸または核酸断片を提供する。さ
10 らに、本発明は、下記 16～18 に記載の核酸または核酸断片の用途を提供する。

1. 配列表の配列番号 1 ないし 4038 に記載の核酸配列からなる群より選ばれ
る 1 つの配列からなる核酸、またはそれに相補的な核酸。

2. ヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であって、配列表
の配列番号 1 ないし 4038 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配
15 列からなる核酸、またはそれに相補的な核酸。

3. 1 つの配列が配列表の配列番号 1 ないし 1913、および配列番号 3982
ないし 4038 に記載の核酸配列からなる群より選ばれることを特徴とする、上
記 2 に記載の核酸。

4. 核酸が DNA であることを特徴とする、上記 3 に記載の核酸。

20 5. 1 つの配列が配列表の配列番号 1914 ないし 3981 に記載の核酸配列か
らなる群より選ばれることを特徴とする、上記 2 に記載の核酸。

6. 核酸が DNA であることを特徴とする、上記 5 に記載の核酸。

7. 予後良好なヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であ
って、配列表の配列番号 1 ないし 1913、および配列番号 3982 ないし 403
25 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなることを特徴とす
る核酸、またはそれに相補的な核酸。

8. 核酸がDNAであることを特徴とする、上記7に記載の核酸。
9. 予後不良なヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であつて、配列表の配列番号1914ないし3981に記載の核酸配列からなる群より選ばれる1つの配列からなることを特徴とする核酸、またはそれに相補的な核酸。
- 5 10. 核酸がDNAであることを特徴とする、上記9に記載の核酸。
11. 予後良好なヒト神経芽細胞腫と、予後不良なヒト神経芽細胞腫とを比較したとき、そのいずれかで発現が増強されている遺伝子に由来する核酸であつて、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強されている遺伝子に由来する核酸であり、かつ配列表の配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列からなる群
- 10 より選ばれる1つの配列からなることを特徴とする核酸、またはそれに相補的な核酸。
12. 核酸がDNAであることを特徴とする、上記11に記載の核酸。
13. 上記1～12のいずれかに記載の核酸の断片。
14. 上記1～12のいずれかに記載の核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズしうる単離された核酸。
- 15 15. 核酸がDNAであることを特徴とする、上記14に記載の核酸。
16. 上記15に記載の核酸からなるPCRプライマー。
17. 上記11の核酸をヒト神経芽細胞腫の臨床組織から検出することを特徴とする、ヒト神経芽細胞腫の予後の診断方法。
- 20 18. 上記12に記載の核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズしうる単離された核酸からなるPCRプライマーの一組を含むことを特徴とするヒト神経芽細胞腫の予後の診断キット。
- 上記の好ましい核酸は、予後良好なヒト神経芽細胞腫と、予後不良なヒト神経芽細胞腫との比較において、予後良好なヒト神経芽細胞腫でのみ発現が増強されている遺伝子に由来するものであり、該核酸の配列に関する情報はヒト神経芽細胞腫の予後の診断を可能にする。
- 25

図面の簡単な説明

図1は、ヒト神経芽細胞腫の臨床組織のゲノムDNA中のN-myc増幅をサザンハイブリダイゼーションで解析した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。図中、レーン1は、予後不良の神経芽細胞腫の細胞株からのゲノムDNA
5 (陽性対照群)である。レーン2は、ヒト正常胎盤のゲノムDNA(予後良好としての陰性対照群)である。レーン3～7は、ヒト神経芽細胞腫の臨床組織(症例1～5)のゲノムDNAである。

図2Aは、予後良好・不良ヒト神経芽細胞腫での遺伝子の発現量を半定量的PCRで調べた結果、発現の増強が認められた遺伝子の一例(予後良好なヒト神経芽細胞腫での発現の増強例)を示す電気泳動写真に対応する図である。図中、レーン1～8、およびレーン18～25は、予後良好なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。レーン10～17、およびレーン27～34は、予後不良なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。レーン9および26は、サイズマーカーである。

図2Bは、予後良好・不良ヒト神経芽細胞腫での遺伝子の発現量を半定量的PCRで調べた結果、発現の増強が認められた遺伝子の別の例(予後不良なヒト神経芽細胞腫での発現の増強例)を示す電気泳動写真に対応する図である。図中、レーン1～8、およびレーン18～25は、予後良好なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。レーン10～17、およびレーン27～34は、予後不良なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。レーン9および26は、サイズマーカーである。

図3は、予後良好・不良ヒト神経芽細胞腫での遺伝子の発現量を半定量的PCRで調べた結果、発現の増強が認められた遺伝子のさらに別の例(予後良好ヒト神経芽細胞腫および予後不良なヒト神経芽細胞腫の両方での発現の増強例)を示す電気泳動写真に対応する図である。図中、レーン1～8、およびレーン18～25は、予後良好なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。レーン10～17、

およびレーン 27～34 は、予後不良なヒト神経芽細胞腫の臨床組織試料である。
レーン 9 および 26 は、サイズマーカーである。

図 4 A は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、全
5 全ての細胞周期で同程度の発現が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に
対応する図である。

図 4 B は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、G
1 期のみで発現の減弱が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応する
図である。

図 4 C は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、S
10 期のみで発現の減弱が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応する図
である。

図 4 D は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、G
2 / M 期のみ発現の減弱が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応す
る図である。

15 図 4 E は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、G
1 期のみで発現の増強が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応する
図である。

図 4 F は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、S
20 期のみで発現の増強が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応する図
である。

図 4 G は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、G
2 / M 期のみで発現の増強が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に対応
する図である。

図 4 H は、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を半定量的 P C R で調べた結果、S
25 および G 2 / M 期で発現の増強が認められた遺伝子の一例を示す電気泳動写真に
対応する図である。

上記A～H中、レーン1は、無処理HeLa細胞である。レーン2は、400 μ Mのmimosineで18時間処理し、65%がG1期の状態のHeLa細胞である。レーン3は、2mMのthymidineで20時間処理し、100%がS期の状態のHeLa細胞である。レーン4は、0.6 μ g/mlのNocodazoleで18時間処理し、85%がG2/M期の状態のHeLa細胞である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係るヒト神経芽細胞腫に発現する新規な遺伝子（以下、「本発明に係る遺伝子」という）に由来する核酸およびそれに関連する核酸断片について（以下、「本発明の核酸」および「本発明の核酸断片」というが、特に核酸とその断片を区別して、記載する必要のないとき、それらを集合的に「本発明の核酸」ともいう）、本発明の好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

本発明の核酸は、上述のごとく本発明に係る遺伝子に由来するものであり、該遺伝子を構成するか或いは該遺伝子からインビボまたはインビトロの過程によって得られる。そこで、本明細書で使用する「核酸」という用語は、例えばDNAまたはRNA、或いはそれから誘導された活性なDNAまたはRNAであるポリヌクレオチドを指し、好ましくは、DNAまたはRNAを意味する。特に好ましい核酸は、本明細書中に開示されるヒトcDNA配列と同一か、または相補的な配列を有する。かかるDNAおよびその断片を以下、「本発明のDNA」および「本発明のDNA断片」というが、特にDNAとその断片を区別して記載する必要のないとき、それらを集合的に「本発明のDNA」ともいう。ここで、DNAは、配列表の配列番号に対応する核酸配列（塩基配列）に示されるように一本鎖DNA（センス鎖）配列で表わされるが、そのみならず該配列に相補的な一本鎖（アンチセンス鎖）、さらにこれらの両者の含む2本鎖DNAをも包含する。

本発明のDNAは、ヒト神経芽細胞腫の臨床組織から得られたものであり、実施例の記載を含めて下記のような特徴を有する。なお、細胞、組織からcDNA

ライブラリーを作製する方法は、当業者に公知であり、例えばサンプブックら、「分子クローニング：実験手法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2巻、第2版、コールドスプリングハーバー (1989)」に記載の方法に準じて作製できる。

- 5 また、本明細書で使用する「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸（または断片）が、サンプブックら (Sambrook, J.) の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現 (Expression of cloned genes in E. coli)」、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 9.47-9.62および11.45-11.61に
- 10 記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。

- より具体的には、前記「ストリンジェントな条件」とは、約45℃において6.0xSSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃において2.0xSSCで洗浄することを指す。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0xSSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2xSSC、50℃まで選択すること、
- 15 ができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ストリンジェンシー条件の約65℃まで増大させることもできる。
- 20

- また、本明細書で使用する「単離された核酸」という用語は、組換えDNA技術により作成された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリヌクレオチドを指す。本発明の核酸もネイティブな状態でない限り、
- 25 通常単離された核酸でありうる。

 神経芽細胞腫は、ヒトでは2種類しか知られていない神経細胞そのものの腫瘍

の1つであり、そこで発現している遺伝子を解析することは、神経細胞のバイオリ
ロジーを理解する上で非常に大きな知見をもたらすものと考えられる。すなわち、
脳や末梢神経から、部位特異的な均質な組織を得ることは極めて困難で、事実上
不可能である。一方、神経芽細胞腫は、末梢交感神経細胞に由来するほぼ均一な
5 神経細胞集団（腫瘍化してはいるが）から成り、均質に発現している神経関連遺
伝子が得られる可能性が高い。また、神経芽細胞腫は癌であるため、神経発生の
未熟な段階で発現している重要な遺伝子が多いことが特徴として挙げられる。

さらに、神経芽細胞腫は、予後の良いものと予後の不良なものとの臨床的、生
物学的にはっきり区別される。予後良好な神経芽細胞腫の癌細胞は、増殖速度が
10 極めて遅く、ある時点から自然退縮を始めることが特徴である。これまでの知見
から、この自然退縮では、神経細胞の分化およびアポトーシス（神経細胞死）が
起こっており、正常神経細胞の成熟段階で起こる分化とプログラム細胞死とが非
常によく似た現象であることが分かってきた。従って、この腫瘍で発現している
遺伝子を解析することによって、神経の分化やアポトーシスに関連した重要な遺
15 伝子情報を入手できる可能性が極めて高い。

予後不良な神経芽細胞腫は、明らかに悪性増殖を続ける癌細胞からなる腫瘍で
ある。従って、神経細胞の増殖に関連した重要な遺伝子や、未分化な神経細胞で
発現している遺伝子が多数存在する可能性が高い。すなわち、予後良好な神経芽
細胞腫で発現している遺伝子のプロファイルとは全く異なる遺伝子情報を入手で
20 きる可能性が極めて高い。

一般的に神経細胞は、他の臓器由来の細胞と比較して、発現している遺伝子の
種類が多いと言われている。神経芽細胞腫の細胞株（セルライン）は、予後不良
の臨床組織由来であり、腫瘍の発生および進行に伴い遺伝子発現のプロファイル
が正常神経細胞と大きく変化しているものと考えられる。

また、神経芽細胞腫は小児由来の腫瘍であることが1つの特徴であり、後天的
な因子の影響が非常に少ない可能性が高く、癌発生のメカニズムの解析とともに

発生学的な情報を入手できる可能性が高いことも予想される。さらに驚くべきことには、本発明の核酸の中に、ある特定の細胞周期にのみ発現が増強する遺伝子の核酸が含まれており、このことから癌発生のメカニズムの解析および発生、分化に関する非常に有用な遺伝子情報を入手できる可能性が高いことが予想される。

上記のような様々な特徴を有し、有用な遺伝子情報を入手できる新規な遺伝子に由来する本発明の核酸は、ヒト神経芽細胞腫の臨床組織から得られ、配列表の配列番号 1 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列のうちの 1 つ、またはその核酸配列の一部を有する。

また、本明細書で使用する「予後良好」とは、ヒト神経芽細胞腫のうち、腫瘍が限局して存在するか、または退縮や良性の交感神経節細胞腫になった状態を指し、N-myc その他の腫瘍マーカー (Trk A、染色体異常など) から判断して、悪性度が低いと判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期 1 または 2、発症年齢が 1 歳未満、手術後 5 年以上再発なく生存し、臨床組織中に N-myc の増幅が認められない症例を予後良好としたが、このような特定の例には限定されない。また、本明細書で使用する「予後不良」とは、ヒト神経芽細胞腫のうち、腫瘍の進行が認められる状態を指し、N-myc その他の腫瘍マーカーから判断して、悪性度が高いと判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期 4、発症年齢が 1 歳以上、手術後 3 年以内に死亡、臨床組織中に N-myc の増幅が認められた症例を予後不良としたが、このような特定の例には限定されない。

前記の分類に従うと、配列表の配列番号 1 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列を有する核酸のうち、予後良好な神経芽細胞腫において発現している遺伝子に由来する核酸は、配列番号 1 ないし 1 9 1 3、および 3 9 8 2 から 4 0 3 8 に記載の核酸配列を有する核酸である。また、予後不良な神経芽細胞腫において発現している遺伝子に由来する核酸は、配列番号 1 9 1 4 ないし 3 9 8 1 に記載の核酸配列を有する核酸である。これら 2 つのグループの核酸は、本発明の核酸のうち、

ともに好適な核酸類を構成する。

さらに、ヒト神経芽細胞腫の予後良好なものと、不良なものの臨床組織における本発明に係る遺伝子の発現量を比較した結果、配列表の配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列に対応する遺伝子において非常に顕著な差が認められた。すなわち、これらの遺伝子は、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強されていた。従って、配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列は、上述の有用な遺伝子情報として以外に、それらの核酸配列を有する核酸を検出することによって、神経芽細胞腫の良不良を診断する腫瘍マーカーの情報としても利用可能である。この理由から、前記配列表の配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列からなる核酸は、本発明の核酸のうち、特に好適な核酸類を構成する。

本発明の核酸は、ヒト神経芽細胞腫およびそれに関連する様々な情報を得るために、下記の手法において有用性がある。

(1) ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の1つの実施の形態に従えば、本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブとして使用することによって、ヒト神経芽細胞腫で発現している遺伝子を検出することが可能である。さらに、本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブとして使用し、様々な腫瘍、正常組織における遺伝子発現を調べることによって、該遺伝子発現の分布を同定することも可能である。

本発明の核酸またはその断片をハイブリダイゼーションのプローブとして使用する場合、ハイブリダイゼーション法自身については、特に限定はない。好適な方法として、例えば、ノザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、Fluorescence in situ hybridization (FISH)、インサンチュハイブリダイゼーション[in situ hybrida

zation (ISH)], DNAチップ法、マイクロアレイ法、等が挙げられる。

前記ハイブリダイゼーションの1つの応用例として、本発明のDNAまたはその断片をノザンハイブリダイゼーションのプロープとして用い、検定したい試料中においてmRNAの長さを測定することや、遺伝子発現を定量的に検出することが可能である。

また別の応用例として、本発明のDNAまたはその断片をサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用い、検定したい試料のゲノムDNA中、当該DNA配列の有無を検出することが可能である。

さらに別の応用例として、本発明のDNAまたはその断片をFluorescence in situ hybridization (FISH) のプロープとして用い、遺伝子の染色体上の位置を同定することも可能である。

さらに別の応用例として、本発明のDNAまたはその断片をインサンチュハイブリダイゼーションのプロープとして用い、遺伝子の発現の組織分布を同定することも可能である。

本発明のDNAまたはその断片をハイブリダイゼーション用プロープとして使用する場合、少なくとも40個の塩基長が必要であり、本発明のDNAまたはその断片のうち、40個以上の連続した塩基があるものが好ましく用いられる。さらに好ましくは、60個以上の塩基を有するものが用いられる。

当業者にとって、上記各種のハイブリダイゼーションにおけるDNAプロープ反応は周知であり、例えば、個々の長さの本発明に係るDNAプロープと、目的DNAとの適当なハイブリダイズ条件は容易に決定することができる。かかる操作は、例えばサンプルックら、「分子クローニング：実験手法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2巻、第2版、コールドスプリングハーバー (1989)」を参照して、行えばよい。

好ましくは、本発明に係るプロープは、容易に検出されうるように標識される。検出可能な標識は、目視によって、または機器を用いるかのいずれかによって検

出され得るいかなる種類、元素または化合物であってもよい。通常使用される検出可能な標識としては、放射性同位元素、アビジンまたはビオチン、蛍光物質（FITCまたはローダミン等）が挙げられる。前記放射性同位元素は、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等である。ビオチン標識されたプローブは、アビジン／ストレプトアビジン、蛍光標識、酵素、金コロイド複合体等などの標識手段を使用したハイブリダイゼーションの後検出される。また、本発明に係るプローブは、タンパク質と結合させることによって標識されてもよい。その目的で、例えば放射性または蛍光ヒストン一本鎖結合タンパク質が使用される。

(2) PCRに用いるプライマー

10 目的遺伝子を検出するには上記のハイブリダイゼーション法の他に、本発明のDNAまたはその断片に含まれる任意の塩基配列をプライマーとして、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いることにより可能である。例えば、検定したい試料からmRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子発現を半定量的に測定することが可能である。このような方法は、当事者にとって周知の方法によって行われるが、例えば、サンプルックら、「分子クローニング：実験手法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第2巻、第2版、コールドスプリングハーバー (1989)」および遺伝子病入門（高久史麿著：南江堂）が参照される。

20 本発明のDNAまたはその断片をPCR用プライマーとして使用する場合、10ないし60個の塩基長が必要であり、本発明のDNAまたはその断片のうち、10ないし60個の連続した塩基があるものが好ましく用いられる。さらに好ましくは、15ないし30個の塩基を有するものが用いられる。また一般的には、プライマー配列中のGC含量が40ないし60%のものが好ましい。さらに、増幅に用いる2つのプライマー間の T_m 値に差がないことが望まれる。また、プライマーの3'末端でアニールせず、プライマー内で2次構造をとらないことも望ましい。

(3) 遺伝子発現のスクリーニング

本発明の核酸またはその断片を使用することによって、様々な組織や細胞で発現している目的遺伝子の発現分布を検出することが可能である。これは例えば、
5 本発明のDNAまたはその断片を上記のようにハイブリダイゼーションのプロープ、またはPCRのプライマーとして使用することによって、可能となる。

またDNAチップ、マイクロアレイ等を用いても目的遺伝子の発現分布を検出することが可能である。すなわち本発明のDNAまたはその断片を直接、前記チップ、アレイ上に張り付ける。そのために高精度分注機でかかるDNA等を基板にスポットする方法が知られている(例えば、米国特許5807522号を参照)。
10 そこに被検組織の細胞から抽出したmRNAを蛍光物質などで標識し、ハイブリダイズさせ、遺伝子がどのような組織の細胞で高発現しているかを解析することが可能である。またチップ、アレイ上に張り付けるDNAは、本発明のDNAまたはその断片をプローブとして用いたPCRの反応産物であってもよい。別法として、本発明のDNA断片を基板上で直接合成して、DNAチップもしくはアレイ
15 とすることもできる(例えば、米国特許5424186号を参照)。

目的遺伝子の発現分布を調べることで、本発明のDNAまたはその断片を様々な遺伝子スクリーニングの指標に使用することが出来る。例えば、癌遺伝子をスクリーニングする場合、癌細胞で強く発現し、正常細胞で弱い発現が認められた目的遺伝子について優先的に解析を進めることも可能である。

20 (4) 遺伝子のクローニング

本発明のDNAまたはその断片を使用することによってヒト神経芽細胞腫において発現している遺伝子をクローニングすることが可能である。このようなクローニングの対象となる遺伝子としては、特に予後良好な神経芽細胞腫と予後不良な神経芽細胞腫との間で発現量に差がある遺伝子、他の組織や癌細胞での発現様式とは異なって発現している遺伝子、細胞周期依存的に発現している遺伝子、神
25 経分化に伴って誘導される遺伝子、癌遺伝子または癌抑制遺伝子によって発現が

制御される遺伝子等が挙げられる。クローニングは、通常の遺伝子組換え技術に従い、本発明のDNAまたはその断片を適当なプラスミド、バクテリオファージに組み込み、発現ベクターを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換（導入）し、形質転換体を培養することによって行われる。かかる個々の操作は、例えば、

5 サンプルックら、「分子クローニング：実験手法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第3巻、第2版、コールドスプリングハーバー (1989)」その他、周知の文献に詳述されている。

(5) 腫瘍の予後診断の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

前述のように配列表の配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列に対応する遺伝子は、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強されていた。そこで、

10 配列番号3982ないし4038に記載の核酸配列を有する核酸を腫瘍マーカーとして、これを検出することによって、ヒト神経芽細胞腫の予後の診断が可能である。すなわち、被験者から採取した、組織（臨床組織）からの細胞を含む試料中で、前記遺伝子の発現の増強の有無を調べることにより行える。遺伝子（またはRNA）の検出方法としては、前述のノーザンブロットハイブリダイゼーション法、インサイチュハイブリダイゼーション法、およびRT-PCR法が挙げられる。

15

ハイブリダイゼーション法を用いるとき、試料中で本発明のDNA（特に、配列番号3982ないし4038に記載の塩基配列の1つのDNA配列を有する）

20 からなるプローブとハイブリダイズする核酸の量が増強する場合、予後が良好であると診断できる。また、RT-PCR法を用いるとき、試料からmRNAを抽出し、これをDNAに逆転写して、前記DNAを基にして作成したプライマーにより増幅し、遺伝子発現を半定量的に測定する。このようにして遺伝子発現の増強が認められる場合、予後が良好であると診断できる。この特定の診断目的のためには、該プライマーを必須成分として一組含有する診断用キットを用いることが好ましい。該診断用キットは、プライマー成分以外に、PCR用の緩衝液、洗

25

浄液、および酵素等の公知の成分を含む。

(6) アンチセンスオリゴヌクレオチド

本発明の別の実施の形態に従えば、本発明の核酸に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明の
5 核酸にハイブリダイズすることが可能であり、アンチセンスDNAとアンチセンスRNAを含む。アンチセンスDNAは、DNAからmRNAへの転写を阻害し、アンチセンスRNAは、mRNAの翻訳を阻害する。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然型であれば自動合成機を使用して、または本発明のDNAを鋳型とするPCR法により合成できる。さらに、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、目的mRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性が改善されたアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体も包含する。このような誘導体は、公知のアンチセンス技術を用いて、合成することができる。

本発明に係る神経芽細胞腫の遺伝子、或いはmRNAの翻訳開始コドン付近、
15 リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、該RNAの合成を阻止することができ、特に遺伝子の発現抑制効果が高い。従って、本発明は、かかるアンチセンスオリゴヌクレオチドを好適に包含する。

(実施例)

20 以下、本発明により見いだされたヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子群について、実施例に即してさらに詳しく説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例に限定されるものではない。

(製造例1) ヒト神経芽細胞腫からのcDNAライブラリーの作製

1. 試料入手

25 ヒト神経芽細胞腫の臨床組織を手術摘出直後に準無菌的に凍結し、その後-80℃に保存して試料とした(以下、症例1~5)。

2. 試料の選別

上記1で得られた試料について予後の検定を以下の基準をもとに行った。

予後良好：

- ・病期1または2
- 5 ・発症年齢が1歳未満
- ・手術後5年以上再発なく生存
- ・N-mycの増幅なし

予後不良：

- ・病期4
- ・発症年齢が1歳以上
- ・手術後3年以内に死亡
- ・N-mycの増幅あり

上記2つの試料において、N-mycの増幅は下記のようにして確認した。

- 上記1で得られた臨床組織を剃刀で細かく切断し、5mlのTENバッファー
 10 (50mM Tris-HCL (pH=8.0) / 1mM EDTA / 100mM NaCl) を加えよくホモジナイズした。この混合液に750 μ lのSDS (10%)、125 μ lのproteinase K (20mg/ml) を加え、軽く混和し、50 $^{\circ}$ Cで8時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿により、ゲノムDNAを精製した。5 μ gの得られたゲノムDNAを制限酵素EcoRI (NEB社製) で完全に消化し、N-myc
 15 のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションによりN-mycの増幅を調べた。ハイブリダイゼーション結果を図1に示す。図1から症例3以外は、陰性対照群とほぼ同じ程度のN-myc増幅しか認められないことから、予後良好の試料と判定された。

20 3. 予後良好なヒト神経芽細胞腫の臨床組織からmRNAの調製

- 上記2において予後良好であると判定された試料 (ヒト神経芽細胞腫の臨床組織) 2~3gをTotal RNA Extraction Kit (QIAGEN社製) 用いて処理し、トータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAを、オリゴdTセルロースカラム (Collaborative社製) を用いて、
 25 poly A構造を有するmRNAのプールとして精製した。

4. mRNAの脱リン酸化

上記3において調製した100~200 μ gのmRNAのプールを67.3 μ lの0.1%ジエチルピロカーボネート (DEPC) を含む蒸留滅菌水に溶解させ、20 μ lの5XBAPバッファー (Tris-HCl (500mM、pH=7.0) /メルカプトエタノール (50mM))、2.7 μ lのRNasin (40unit/ μ l: Promega社製)、10 μ lのBAP (0.25unit/ μ l、バクテリア由来アルカリフォスファターゼ: 宝酒造社製) を加えた。この混合液を37°Cで1時間反応させ、mRNAの5'末端の脱リン酸化処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理を2回行い、最後にエタノール沈殿により、脱リン酸化mRNAのプールを精製した。

10 5. 脱リン酸化mRNAの脱キャップ処理

上記4において調製した脱リン酸化mRNAのプールの全量を75.3 μ lの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、20 μ lの5XTAPバッファー (酢酸ナトリウム (250mM、pH=5.5) /メルカプトエタノール (50mM)、EDTA (5mM、pH=8.0))、2.7 μ lのRNasin (40unit/ μ l)、2 μ lのTAP (Tobacco acid pyrophosphatase: 20unit/ μ l)) を加えた。この混合液を37°Cで1時間反応させ、脱リン酸化mRNAの5'末端の脱キャップ処理を行った。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化mRNAは脱キャップ処理されず5'末端は脱リン酸化された状態に留まる。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、脱キャップmRNAのプールを精製した。

20 6. オリゴキャップmRNAの調製

上記5において調製した脱キャップmRNAのプールの全量を11 μ lの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、4 μ lの5'-オリゴRNA (5'-AGCAUCGAGUCGGCCUUGGCCUACUGG-3': 100ng/ μ l)、10 μ lの10Xligationバッファー (Tris-HCl (500mM、pH=7.0) /メルカプトエタノール (100mM))、10 μ lの

塩化マグネシウム (50 mM)、2.5 μ l の ATP (24 mM)、2.5 μ l の RNasin (40 unit/ μ l)、10 μ l の T4 RNA ligase (25 unit/ μ l: 宝酒造社製)、50 μ l のポリエチレングリコール (50% w/v、PEG 8000: シグマ社製) を加えた。この混合液を 20°C で 3 時間反応させ、脱キャップ mRNA の 5' 末端に 5' -オリゴRNA を連結した。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化 mRNA は、5' -オリゴRNA が連結されない。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、オリゴキャップ mRNA のプールを精製した。

7. オリゴキャップ mRNA から DNA 除去

- 上記 6 において調製したオリゴキャップ mRNA のプールを 70.3 μ l の 0.1% DEPC を含む蒸留滅菌水に溶解させ、4 μ l の Tris-HCl (1M、pH=7.0)、5.0 μ l の DTT (0.1M)、16 μ l の塩化マグネシウム (50 mM)、2.7 μ l の RNasin (40 unit/ μ l)、2 μ l の DNase I (5 unit/ μ l: 宝酒造社製) を加えた。この混合液を 37°C で 10 分間反応させ、余分な DNA を分解した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿、カラム精製 (S-400 HR: ファルマシアバイオテック社製) により、DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプールを精製した。

8. 1st strand cDNA の調製

- 上記 7 において調製した DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプールを Super Script II (ライフテックオリエンタル社製キット) を用いて逆転写し、1st strand cDNA のプールを得た。DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプールを 21 μ l の滅菌蒸留水に溶解させ、10 μ l の 10X First Strand バッファー (キット付属品)、8 μ l の dNTP mix (5 mM、キット付属品)、6 μ l の DTT (0.1M、キット付属品)、2.5 μ l のオリゴ-dT アダプタープライマー (5 pmol/ μ l、5' -GCGGCTGAAGACGGCCTATGTGGCCTTTTTTTTTTTTTT

TTTTT-3'), 2.0 μ l の RNasin (40 unit/ μ l)、2 μ l の Super Script II RTase (キット付属品) を加えた。この混合液を 42°C で 3 時間反応させ、逆転写反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、アルカリ処理、中和処理にて全ての RNA を分解し、エタノール沈殿で精製した。

9. 2nd strand cDNA の調製

上記 8 において調製した 1st strand cDNA のプールを Gene Amp (パーキンエルマー社製キット) を用いて、PCR 増幅を行った。1st strand cDNA のプールを 52.4 μ l の滅菌蒸留水に溶解させ、30 μ l の 3.3X Reaction バッファー (キット付属品)、8 μ l の dNTP mix (2.5 mM、キット付属品)、4.4 μ l の酢酸マグネシウム (25 mM、キット付属品)、1.6 μ l のプライマー F (10 pmol/ μ l、5' -AGC ATCGAGTCGGCCTTGTTG-3'), 1.6 μ l のプライマー R (10 pmol/ μ l、5' -GCGCTGAAGACGGCCTATGT-3'), 2 μ l の rTth (キット付属品) を加えた。この混合液に、100 μ l のミネラルオイルを静かに加え重層した。この反応液を 94°C で 5 分間変性させた後、94°C、1 分間・52°C、1 分間・72°C、10 分間を 1 サイクルとして 12 サイクル繰り返し、さらに 72°C で 10 分間放置し PCR 反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し 2nd strand cDNA のプールを得た。

10. 2nd strand cDNA の Sfi I 処理

上記 9 において調製した 2nd strand cDNA のプールを 87 μ l の滅菌蒸留水に溶解させ、10X NEB バッファー (NEB 社製)、100X BSA (ウシ血清アルブミン、NEB 社製)、2 μ l の Sfi I (制限酵素、20 unit/ μ l、NEB 社製) を加えた。この混合液を 50°C で一晩反応させ、Sfi I による制限酵素処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エ

タノール沈殿で精製し、両末端がS f i I処理されたcDNAのプールを得た。

11. S f i I処理されたcDNAのサイズ分画

上記10において調製したS f i I処理されたcDNAのプールを1%のアガロースゲルで電気泳動し、2 kb以上の分画をGene clean II (Bio 101社製)を用いて精製した。精製したcDNAのプールは100 μ lの滅菌蒸留水に溶解させ、37°Cで6時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、長鎖cDNAのプールを得た。

12. cDNAライブラリー

上記11において作製した長鎖cDNAのプールをDNA Ligation kit ver. 1 (宝酒造社製キット)を用いてクローニングベクターであるpME18S-FL3 (東京大学医科学研究所 菅野純夫教授より供与)にライゲーションを行った。長鎖cDNAのプールを8 μ lの滅菌蒸留水に溶解させ、あらかじめ制限酵素Dra IIIで処理された1 μ lのpME18S-FL3、80 μ lのSolution A (キット付属品)、10 μ lのSolution B (キット付属品)を加え、16°Cで3時間反応させた。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製しcDNAライブラリーを得た。

(実施例2) 大腸菌へのトランスフォーメーション

1. クローニング

実施例1の12で調製したcDNAライブラリーを大腸菌 (TOP-10: Invitrogen社製) にトランスフォーメーションした。cDNAライブラリーを10 μ lの滅菌蒸留水に溶解し、TOP-10に混合した。その後、氷上にて30分間、40°Cで1分間、氷上で5分間インキュベートした。500 μ lのSOB培地を加え、37°Cで60分間振盪培養した。アンピシリンを含む寒天培地上に適量つつ播種し、37°Cで一昼夜培養して、大腸菌クローンを得た。

25 2. 大腸菌クローンの保存 (グリセロールストックの調製)

上記1において得られた寒天培地上の大腸菌クローンを、爪楊枝にて拾い上げ、

96穴プレートに準備した120 μ lのLB培地中に懸濁させた。この96穴プレートを37 $^{\circ}$ Cで一晩静置し大腸菌の培養を行った。その後60%グリセロール溶液を72 μ l加え、-20 $^{\circ}$ Cで保存した(グリセロールストック)。

(実施例3) 塩基配列決定

5 1. プラスミドの調製

実施例2の2で調製した10 μ lのグリセロールストックを15mlの遠心チューブに移し、3mlのLB培地、50 μ g/mlのアンピシリン加え、37 $^{\circ}$ Cで一晩振盪し大腸菌の培養を行った。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製)を用いて大腸菌からプラスミドDNAを抽出、精製した。

10

2. 両末端シーケンスの解析

上記1において調製したプラスミドDNAをDNA Sequencing Kit (ABI社製キット)を用いて両末端のシーケンスを決定した。600ngのプラスミドDNA、8 μ lのプレミックス(キット付属品)、3.2pmolのプライマーを混合し滅菌蒸留水で合計20 μ lになるように調製した。プライマーは、5'末端シーケンス用として1種類(CTTCTGCTCTAAAGCTGCG)、3'末端シーケンス用として2種類(CGACCTGCAGCTCGAGCACAおよびTGTGGGAGGTTTTTTCTCTA)のものを使用した。この混合液を96 $^{\circ}$ Cで2分間変性させた後、96 $^{\circ}$ C、10秒間・50 $^{\circ}$ C、5秒間・60 $^{\circ}$ C、4分間を1サイクルとして25サイクル繰り返し反応を行った。その後エタノール沈殿で精製した。変性条件下でポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、ABI377 (ABI社製)を用いて配列決定を行った。

20

(実施例4) データベースを用いたホモロジー検索

25 実施例3において両末端シーケンスを解析して得られた試料の塩基配列情報についてインターネットを介した塩基配列のホモロジー検索を行った。検索には

NCBI (National Center of Biotechnology Information USA) のBLASTを用いた。予後良好・不良あわせて約8000遺伝子の解析を行った結果、約半分の遺伝子についてホモロジー無しであった。これらの遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号1ないし4038に示す。

(実施例5) 半定量的PCRによる予後良好・不良ヒト神経芽細胞腫での遺伝子の発現量の比較

実施例4において得られた、新規な遺伝子群の一部から、PCRプライマーを合成し、ヒト神経芽細胞腫の予後良好・不良の臨床組織で発現量を比較定量した。

実施例1-3で示した方法で前記ヒト神経芽細胞腫の臨床組織からmRNAを抽出し、rTaq (宝酒造社製) を用いてPCR反応を行った。具体的には、5 μ lの滅菌蒸留水、2 μ lのmRNA、1 μ lの10XrTaqバッファー、1 μ lの2mM dNTPs、各々0.5 μ lの合成プライマーセット、0.5 μ lのrTaqを混合した。この混合液を95℃で2分間変性させた後、95℃、15秒間・55℃、15秒間・72℃、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72℃で6分間放置しPCR反応を行った。この反応液を1%のアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動の結果の1例を図2(a)、(b)、図3に示す。560個の新規遺伝子について解析を行ったところ、予後良好な神経芽細胞腫でのみで発現の増強が認められものが37個あった。その一例が図2(a)に示されている。

(実施例6) 半定量的PCRによる細胞周期依存的遺伝子の発現量の測定

実施例4において得られた、新規遺伝子群の一部から、PCRプライマーを合成し、HeLa細胞を用いて、細胞周期特異的な遺伝子の発現量を比較定量した。使用したHeLa細胞はそれぞれ以下のように処理を行った。

(1) 無処理

(2) 400 μ Mのmimosineで18時間処理し65%の細胞がG1期の

状態

(3) 2 mMのthymidineで20時間処理し100%の細胞がS期の状態

5 (4) 0.6 μ g/mlのNocodazoleで18時間処理し85%の細胞がG2/M期の状態

10 以上4種類のHeLa細胞から実施例1-3で示した方法でmRNAを抽出し、rTaq（宝酒造社製）を用いてPCR反応を行った。具体的には、5 μ lの滅菌蒸留水、2 μ lのmRNA、1 μ lの10XrTaqバッファー、1 μ lの2 mM dNTPs、各々0.5 μ lの合成プライマーセット、0.5 μ lのrTaqを混合した。この混合液を95℃で2分間変性させた後、95℃、15秒間・55℃、15秒間・72℃、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72℃で6分間放置し、PCR反応を行った。この反応液を1%のアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動の結果の一例を図4に示す。66個の新規遺伝子について解析を行った。解析結果を表1に示す。

15

【表 1】

半定量RT-PCRによる細胞周期特異的遺伝子発現の解析結果

| 細胞周期特異性 | 遺伝子数 |
|---------------------------|------|
| 全ての細胞周期において発現が認められなかった遺伝子 | 20 |
| 全ての細胞周期において発現が認められた遺伝子 | 9 |
| G1期のみで発現の減弱が認められた遺伝子 | 2 |
| G2/M期のみで発現の減弱が認められた遺伝子 | 2 |
| S期のみで発現の減弱が認められた遺伝子 | 1 |
| G1期のみで発現の増強が認められた遺伝子 | 5 |
| S期のみで発現の増強が認められた遺伝子 | 16 |
| G2/M期のみで発現の増強が認められた遺伝子 | 8 |
| S期とG2/M期で発現の増強が認められた遺伝子 | 3 |
| 計 | 66 |

産業上の利用可能性

- 5 本発明の核酸は、神経芽細胞腫において発現する新規な遺伝子に由来する核酸であり、従って、該遺伝子の情報を明らかにする。

本発明のDNAまたはその断片は、プローブ或いはプライマーとして、各種ハイブリダイゼーションまたはPCR法に使用でき、前記遺伝子の他組織、細胞での発現の検出や、その構造および機能の解析が可能となる。また、該遺伝子がコードするヒト蛋白の遺伝子工学的製造も可能となる。

- 10 本発明の核酸は、予後良好な神経芽細胞腫と予後不良な神経芽細胞腫において、それぞれ発現が認められた遺伝子の核酸を含み、従って、これらの遺伝子情報に基づいて神経芽細胞腫の発症および進行程度を、遺伝子の発現レベルで診断することが可能となる。特に、本発明の核酸は、予後良好なヒト神経芽細胞腫と、予後不良なヒト神経芽細胞腫とを比較したとき、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強されている遺伝子の核酸を含み、従って、これらの遺伝子情報に基づいて神経芽細胞腫の予後の遺伝子診断が可能となる。該遺伝子は、N-myc 遺伝子
- 15

子が予後不良因子であるのに対して、T r k A遺伝子と同様に予後良好因子と見なされるので、神経芽細胞腫の悪性度および抗癌剤に対する感受性の指標（腫瘍マーカー）となり得る。

請求の範囲

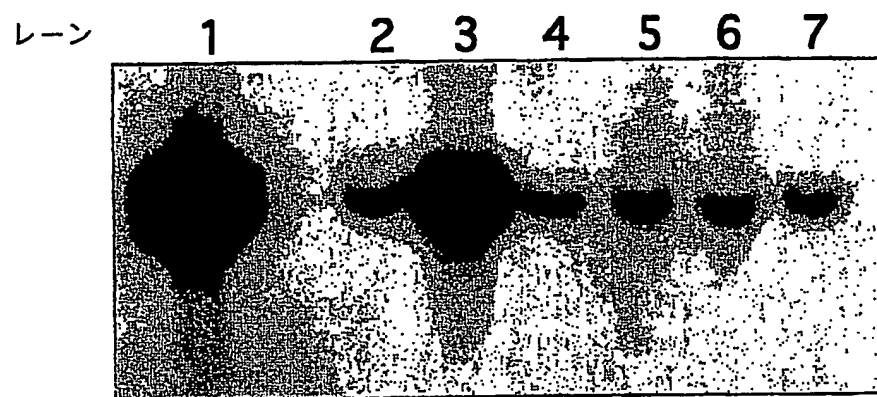
1. 配列表の配列番号 1 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなる核酸、またはそれに相補的な核酸。
- 5 2. ヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であって、配列表の配列番号 1 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなる核酸、またはそれに相補的な核酸。
3. 前記 1 つの配列が配列表の配列番号 1 ないし 1 9 1 3、および配列番号 3 9 8 2 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 2 に記載の核酸。
- 10 4. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 3 に記載の核酸。
5. 前記 1 つの配列が配列表の配列番号 1 9 1 4 ないし 3 9 8 1 に記載の核酸配列からなる群より選ばれることを特徴とする、請求項 2 に記載の核酸。
6. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 5 に記載の核酸。
7. 予後良好なヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であって、配列表の配列番号 1 ないし 1 9 1 3、および配列番号 3 9 8 2 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなることを特徴とする核酸、またはそれに相補的な核酸。
- 15 8. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 7 に記載の核酸。
9. 予後不良なヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸であって、配列表の配列番号 1 9 1 4 ないし 3 9 8 1 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなることを特徴とする核酸、またはそれに相補的な核酸。
- 20 10. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 9 に記載の核酸。
11. 予後良好なヒト神経芽細胞腫と、予後不良なヒト神経芽細胞腫とを比較したとき、そのいずれかで発現が増強されている遺伝子に由来する核酸であって、予後良好なヒト神経芽細胞腫で発現が増強されている遺伝子に由来する核酸であ
- 25

り、かつ配列表の配列番号 3 9 8 2 ないし 4 0 3 8 に記載の核酸配列からなる群より選ばれる 1 つの配列からなることを特徴とする核酸、またはそれに相補的な核酸。

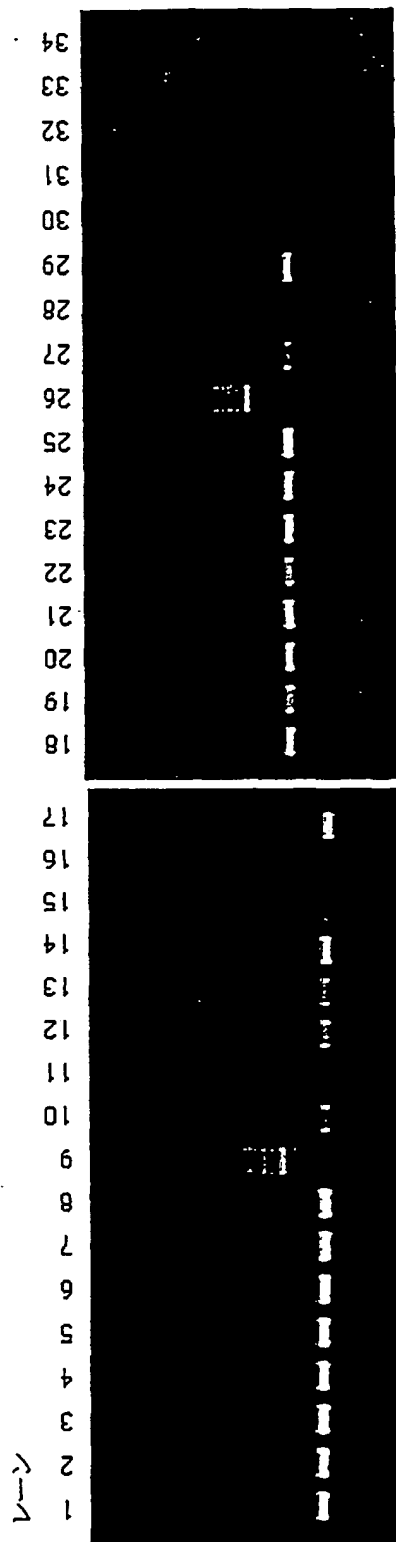
- 1 2. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の核酸。
- 5 1 3. 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の核酸の断片。
- 1 4. 請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズしうる単離された核酸。
- 1 5. 核酸が DNA であることを特徴とする、請求項 1 4 に記載の核酸。
- 1 6. 請求項 1 5 に記載の核酸からなる PCR プライマー。
- 10 1 7. 請求項 1 1 の核酸をヒト神経芽細胞腫の臨床組織から検出することを特徴とする、ヒト神経芽細胞腫の予後の診断方法。
- 1 8. 請求項 1 2 に記載の核酸とストリンジェントな条件でハイブリダイズしうる単離された核酸からなる PCR プライマーの一組を含むことを特徴とするヒト神経芽細胞腫の予後の診断キット。

15

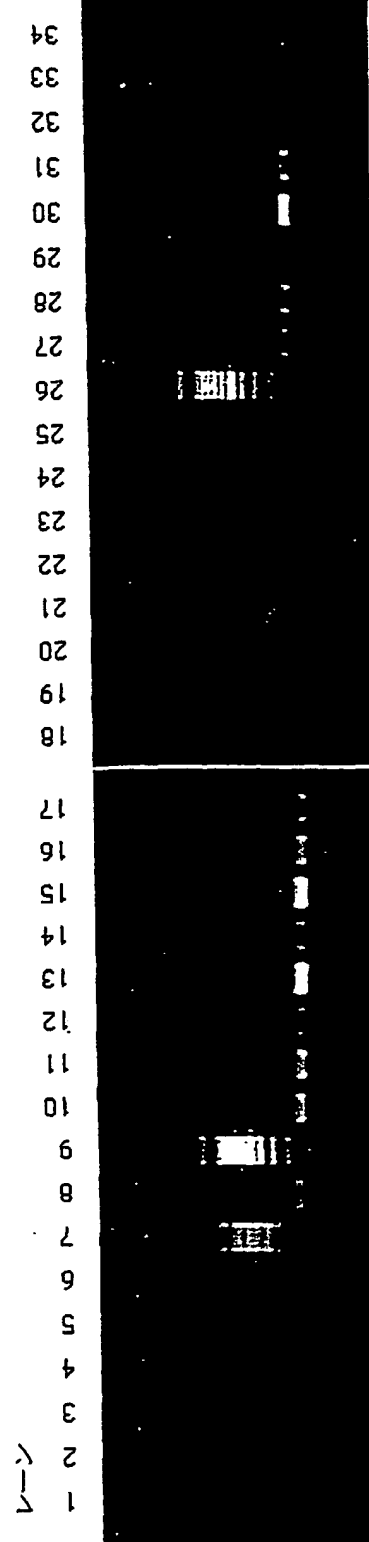
図1



2A



2B



3

1

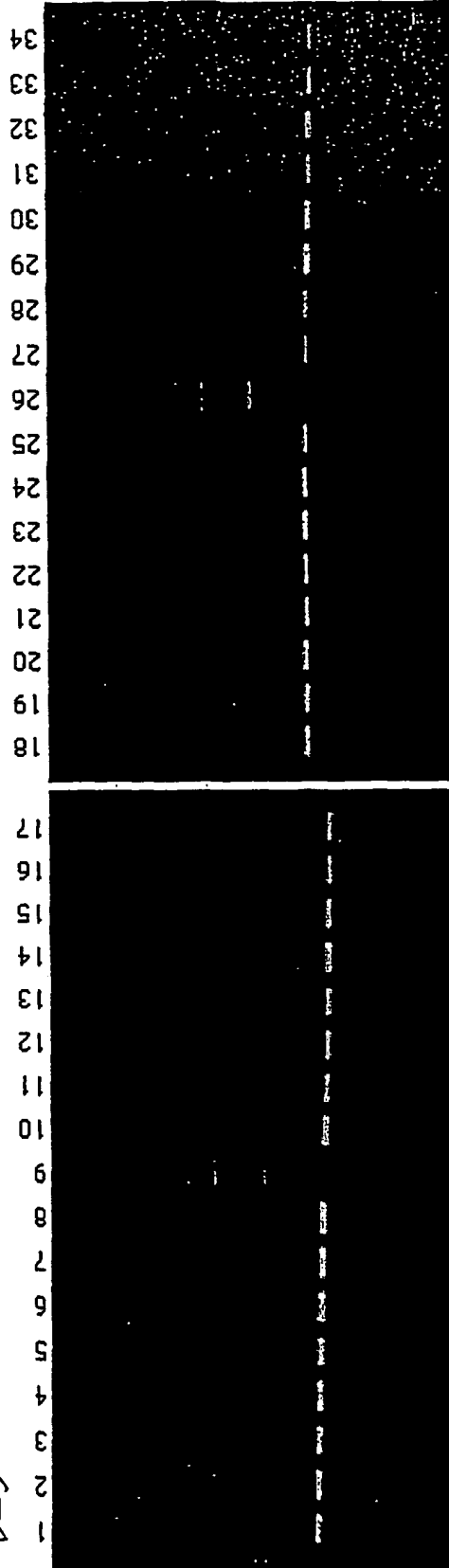


図4A

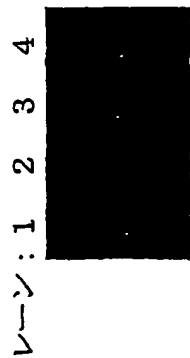


図4B

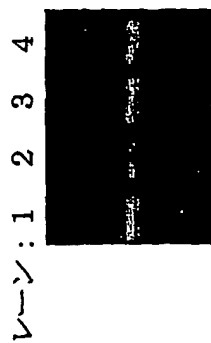


図4C

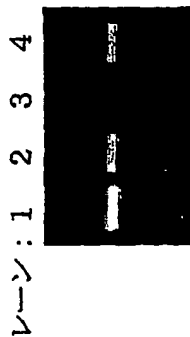


図4D

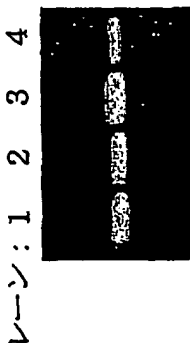


図4E

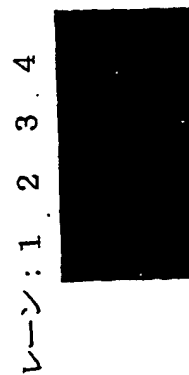


図4F

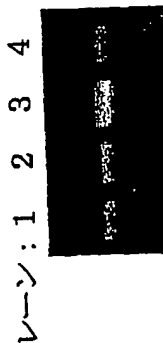


図4G

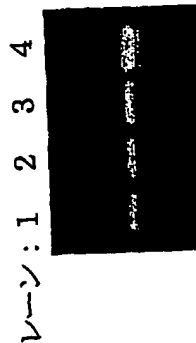
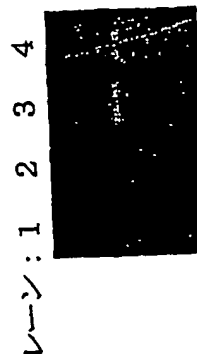


図4H



SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

<120> Novel genes cloned in human neuroblastoma and fragments thereof

<130> FP01-0014-00

<150> JP 2000/159195

<151> 2000-03-07

<160> 4038

<170>

<210>1

<211>798

<212>DNA

<213>homo sapiens

<221>nbla-00001-f

<400>1

gnatcctctagcactgtcgggcctacttatccctaaaaatgtaagatggcattgagggaaagggtataatgatagtacttctgaa
tgtttttaagttgaattgttgtaaacttctgcagaattgggtgagatgtgtgttaaaactgacaaacctggctgaaagcttag
ggcgttcacacctgtgtctccttagcctgagttgggtatgtcaagcttaccgtaagtcttaggatttatttcttgggtgc
ctaaaaagaataaattgaaagtacttctgttcttggcacatttggccagcggatgcaacttctatcctcagtcagttcatatat
ctcaggcagtgatccatttgtatcagccaattccctgttanggccgctagacccggctggcaaccaagagcaacacitc
cccaacttcagcaagaacttctcaactcangtgtgtgttttaaaagcaatangcagcttccatcagcaatgggnagtgtcccc
actccaatggagggtgcaatcgctggacctgaggaantggggaagcattacaaacctcctgcagtaagaatggcagagttg
ggaangatcttctcgcangctgttgggccaactcctccttctgtgtatgagggcatcctaagttttaaggcgttttcaaagc

<211>749

<212>DNA

<213>homo sapiens

<221>nbla-11524-r1

<400>3098

gnnngnggggnnnnnttggtggccttignnnccctttttatagtcacaaattattttcattgggatgccatttttgaaga
attcctaagactaatgtttcttgacatgcaagagttagcattaatagcttacgttactataaatactgctgcttgggaagcagtacaa
ctgttttagagtttaagactacagactttcattactcaaactttattcagtaaagtataaaatcagaagggttctgaacagctggta
ggaaggtagccaagatgcaggaaagatgtctgcgcctcctttcaagggcagccaactcttgaaacagtaggtgccaaaatc
cacatggcctttatagcttccaccaccagcagccctttctgaccgtaggtaactttcccatcaaattcatccactggtacctttat
atccggctcaacctgagaaatggtacagttcagggtgttctctatctcagatagtaactgcatctcgttgtaccatatggtacagc
ctccatcttcttgagtcttgtgtataaacaccctttccacggctgctacatacatggtaccaaaccttttcttttctggtgccacc
agggaattgccagaccatcctttcagctcttctactctgccaattcgatgtccgtagnnttgcttttcatcgggcagagtgc
atttatacataaggaacaccgtggataatctcttagcagctacatctgncaa

<210>3099

<211>744

<212>DNA

<213>homo sapiens

<221>nbla-11525-f

<400>3099

gnnnnnnnnntgnnnnnnnttgaancccttgggcactgccggcctactggcttccgcacactgaagagtacgtcttcgggt
ctaccctaatcacataatggctgtgtttaatcagaagctgtctcggacatgattaaagagtttcgaaaaaattggcgtgctctt
gtaactctgagagaactactctatgtggtgcagactccacgtcttggcattgcagctttctatggcagagaacaacaaacagc
acagtggagaatttacagtctctctcagtgatgttttattgacatggaaatacttgctccatgagaaattgaacttaccagttgaaa

acatggacgtgactgaccattatgaggacgttaggaagatttatgatgatttcttgaagaacagtaatatgttanatctgattgat
gtttatcaaaaatgtagggctttgacttctaattgtgaaaattataacacagtatctcctgggtcaactatacagccaccttcagaa
agaggaagcittgctgctgtctaggccagatctcttggctcctggggaagatccaccagtgtcagcctcattgactctggagcg
gcagaaggagagnccctcttagcatggagctggtcctaaacttcagattgcctgggattccatcacgggtccagaagaagag
acgagacctgaagaactggcggctgcatgcggcaagtgagacaatggggaaagccacccttann

<210>3100

<211>747

<212>DNA

<213>homo sapiens

<221>nbla-11525-r1

<400>3100

ggggnnnnnnttgtgtggccttgannccctinnntttinnntttactgttcttctacttggaaaattactaagtacttcatgatttctt
tacctaataatcttcttgtgctttaaatatttattgtgcttaagttcaagaaactaatttgggtctgaattgatctaccaaagggttgg
gaacccttttttttaacgtcatgaaaatgattttaataagtatcagatgaaattactctgaagtatttatcfaatgttatgaatt
acaaaggaaagtctgctttttatactttcatgttgatttgaaaaagtaataaccttcttattttatctgataattttataaccagat
aataactgtcacaggaaaacagtgaacaactgaattgtcagcttacacaggaggaactagctcataaaacttacaatgnnta
aacatactacacagtaataaaattcttaccacatatgtagaacatcaatacacgaaatttatagtaaccagtaactgcaactacc
agcctgcatctaatacccttttgtgagtaattcatcattacatctctgctagaaaccttaaaagaaatgtgggtgctcccaggag
aactggaaccttgatctggaatactttccacccatcctgcagttgagagtaaatctttacacctgnctcttaaacaggaagatc
ctagatgggccttanactataattaatgnnctgngnttttca

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01629

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| P, X | OHIRA, M. et al., "Hunting the subset-specific genes of neuroblastoma: expression profiling and differential screening of the full-length-enriched oligo-capping cDNA libraries", Med. Pediatr. Oncol. (December, 2000) Vol.35, No.6, pp.547-549 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | Takemasa KAWAMOTO et al., "Tadankai Hatsugan; Zouki Tokuissei to Kyoutsuten; Nou, Shinkei Shuyou no Tadankai Hatsugan", Mol. Med. (1999) Vol.36, No.4, pp.366-372 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | Naoyuki TAKADA et al., "Shuyou Maker no Sentaku to Yomikata; Gan Shindan ni okeru Shuyou Maker no Yuyousei to Genkai; Shouni Gan" Rinshou to Kenkyu (1998) Vol.75, No.3, pp.546-552 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | Akira HORII et al., "1p36 no Genome Kaiseki", Genome Science : Hito Genome Kaiseki ni motozuku Bio Science no Shintenkai (1999) pp.116-118 | 1-4, 7-8, 13-16 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 June, 2001 (05.06.01)Date of mailing of the international search report
19 June, 2001 (19.06.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01629

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | WO, 98/21366, A1 (QBI ENTERPRISES.LTD.), 22 May, 1998 (22.05.98) & AU, 9854421, A & EP, 960212, A1 & US, 6057111, A & JP, 2001-504694, W | 1-4, 7-8, 13-16 |
| P,A | DIAS NETO, E. et al., "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags", Proc. Natl. Acad. Sci., USA (28 March 2000) Vol.97, No.7, pp.3491-3496 | 1-4, 7-8, 13-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01629

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 17 pertains to diagnostic methods practiced on the human body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 16 and 18 relate to nucleic acids respectively comprising the nucleic acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 4038. However, nucleic acids comprising the nucleic acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 4038 cannot be considered as having a common structure. Also, nucleic acids "originating in a gene expressed in human neuroblastoma" cannot be regarded as being novel. Therefore, the inventions as set forth in claims 1 to 16 and 18 are classified into 4038 groups of inventions of the nucleic acids respectively having the nucleic acid sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 4038 and these groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Nucleic acid comprising the nucleic acid sequence represented
by SEQ ID NO:1 in claims 1 to 4, 7, 8 and 13 to 16.

- Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/11, C12Q 1/68, G01N 33/53, G01N 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST7714 (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| P, X | OHIRA, M. et al. "Hunting the subset-specific genes of neuroblastoma: expression profiling and differential screening of the full-length-enriched oligo-capping cDNA libraries", Med. Pediatr. Oncol. (2000. Dec.) Vol. 35, No. 6, p. 547-549 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | 河本 竹正 他「多段階発癌 臓器特異性と共通点 脳・神経腫瘍の多段階発癌」Mol. Med. (1999) Vol. 36, No. 4, p. 366-372 | 1-4, 7-8, 13-16 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.06.01

国際調査報告の発送日

19.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二



4B 9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | 高田 尚幸 他「腫瘍マーカーの選択と読み方 癌診断における腫瘍マーカーの有用性と限界 小児癌」 臨床と研究(1998)Vol. 75, No. 3, p. 546-552 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | 堀井 明 他「1 p 3 6 のゲノム解析」ゲノムサイエンス：ヒトゲノム解析に基づくバイオサイエンスの新展開(1999)p. 116-118 | 1-4, 7-8, 13-16 |
| A | WO, 98/21366, A1 (QBI ENTERPRISES. LTD.) 22. 5月. 1998(22. 05. 98) & AU, 9854421, A & EP, 960212, A1 & US, 6057111, A & JP, 2001-504694, W | 1-4, 7-8, 13-16 |
| P, A | DIAS NETO, E. et al. "Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags", Proc. Natl. Acad. Sci., USA (2000. Mar. 28) Vol. 97, No. 7, p. 3491-3496 | 1-4, 7-8, 13-16 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲17は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-16、18に記載された発明は、配列番号1~4038のいずれかに記載の核酸配列からなる核酸に係る発明であるが、配列番号1~4038に記載の核酸配列からなる核酸は共通な構造を有するとはいえず、また、「ヒト神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する」核酸は新規であるとは認められないので、請求の範囲1-16、18に記載された発明は、配列番号1~4038のいずれかに記載の核酸配列からなる核酸の4038の発明群に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-4、7-8、13-16のうち配列番号1に記載の核酸配列からなる核酸

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。